 doi 10.3969/j.issn.1674-4500.2017.02.13 分子影像学杂志2017年第40卷第2期

临床研究

化橘红对糖尿病心肌病心肌细胞TGF-β1/Smad信号通路的干预作用

杨 澄[1],刘历威[2]

[1]肇庆医学高等专科学校内科,广东 肇庆 526060;[2]南方医科大学第二临床医学院,广东 广州 510282

摘要:目的 观察化橘红对糖尿病心肌病(DCM)大鼠心肌细胞TGF-β1/Smad信号通路的干预作用。**方法** (1)构建DCM大鼠模型,将40只大鼠用链脲佐菌素处理后,15只血糖浓度<16.7 mmol/L的大鼠纳入空白对照组,剩余的25只血糖浓度>16.7 mmol/L的大鼠随机分为DCM组(*n*=11)与化橘红组(*n*=14)。化橘红组大鼠给予化橘红400 mg/(kg·d)灌胃,DCM组和对照组给予等量生理盐水灌胃。测量各组大鼠不同时间点血糖(1、8、16、22周);测量心功能相关指标;光镜下观察心肌形态学改变,电镜下心肌纤维化定量分析;测定心肌胶原总量;免疫组化测定心肌胶原;Western印迹检测心肌细胞TGF-β1、Smad、MMP-9、MMP-2、TIMP-1等蛋白含量;RT-PCR检测TGF-β1、MMP-9、MMP-2、TIMP-1等蛋白的mRNA表达。(2)构建心肌成纤维细胞增殖模型,随机分为两组,化橘红预处理组为血清培养基加0.5 mmol/L化橘红,而对照组为等量血清培养基。检测两组一氧化氮变化、TGF-β1蛋白、c-fos蛋白、p27蛋白,iNOS蛋白、Cyclin D蛋白表达情况。**结果** 化橘红组的大鼠各时间点血糖、心肌纤维化、心肌胶原总量及各型胶原较DCM组显著下降,心收缩、舒张功能明显改善(*P*<0.05),TGF-β1、Smad、MMP-9、MMP-2、TIMP-1蛋白的表达明显下调(*P*<0.05),相关蛋白的mRNA表达也明显抑制(*P*<0.05)。化橘红预处理组一氧化氮、TGF-β1蛋白、c-fos蛋白、p27蛋白,iNOS蛋白、Cyclin D蛋白表达情况较对照组相比明显下降(*P*<0.05)。**结论** 化橘红对DCM中TGF-β1/Smad通路起到了抑制作用,从而调控其下游的MMPs/TIMPs等通路,改善DCM的心肌纤维化进程,抑制心肌肥厚,减少心肌的损伤。

关键词: 化橘红;糖尿病心肌病;TGF-β1;Smad

Effect of exocarpium on TGF-β1/Smad signal pathway in diabetic cardiomyopathy rat myocardial cells

YANG Cheng[1], LIU Liwei[2]

[1]Department of Internal Medicine, Zhaoqing Medical College, Zhaoqing 526060, China; [2]the Second Clinical College, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: Objective To observe the effect of exocarpium on TGF-β1/Smad signal pathway in diabetic cardiomyopathy (DCM) rat myocardial cells. **Methods** 1) To construct the model of DCM rats, 40 rats were treated with streptozotocin, 15 rats with blood glucose <16.7 mmol/L were in blank control group. The remaining 25 rats with blood glucose >16.7 mmol/L were randomly divided into diabetic cardiomyopathy group (DCM group, *n*=11) and exocarpium group (*n*=14). Rats of exocarpium group were given exocarpium [400 mg/(kg·d)], DCM group and control group were given normal saline. Different time of blood glucose (1, 8, 16, 22 weeks) were measured.Heart function index measurement, myocardial morphological changes were observed under light microscope.Quantitative analysis of myocardial fibrosis was performed by electron microscopy. Myocardial collagen amount, myocardial collagen content was determined by immunohistochemistry. Western blot detection of myocardial protein of TGF-β1, Smad, MMP-9, MMP-2, TIMP-1 and RT-PCR detection of mRNA of TGF-β1, MMP-9, MMP-2, TIMP-1.2) To construct the myocardial fibroblast proliferation model.All were randomly divided into two groups, there is serum medium with 0.5 mmol L-1 exocarpium in exocarpium pretreatment group, while the control group with serum medium. To detect two groups of NO changes, TGF-β1 protein, c-fos protein, p27 protein, iNOS protein, the expression of Cyclin D protein. **Results** Compared with DCM group, each time point of blood glucose, myocardial fibrosis, myocardial collagen and the total collagen were significantly decreased and systolic, diastolic function improved significantly In exocarpium groups (*P*<0.05). TGF-β1, Smad, MMP-9, MMP-2, TIMP-1 protein expression were significantly reduced in exocarpium groups (*P*<0.05). Protein mRNA expression was significantly inhibited in exocarpium groups (*P*<0.05). Compared with control group, NO, TGF-β1 protein, c-fos protein, p27 protein, iNOS protein, Cyclin D protein decreased significantly in pretreatment group (*P*<0.05). **Conclusion** Exocarpium on TGF-β1/Smad pathway in diabetic cardiomyopathy performs an effect of inhibitory. It regulates downstream MMPs/TIMPs pathway, improve myocardial fibrosis, inhibit myocardial hypertrophy and reduce myocardial injury.

Keyword: exocarpium; diabetic cardiomyopathy; TGF- β1; smad

收稿日期:2017-03-14

基金项目:肇庆医学高等专科学校创新强校工程建设项目(20140412)

作者简介:杨 澄,医师,博士,E-mail: zqmcyc@126.com;

糖尿病心肌病(DCM)是一种独立的糖尿病心血管并发症[1],与糖尿病患者的高心力衰竭发生率和高死亡率密切相关。现已明确参与糖尿病心肌纤维化的调控因素有肾素-血管紧张素-醛固酮系统、内皮素、一氧化氮、糖基化终末产物、基质金属蛋白酶(MMPs)、TGF-β1等[2]。化橘红是我国广东化州特有的药材[3],其中柚皮苷是其主要成分,国内外多项研究显示了化橘红对DCM大鼠有积极影响。Jung等[4]发现化橘红能有效改善DCM大鼠的糖脂代谢,梁建光等[5]研究发现化橘红通过调节NF-κB通路对DCM大鼠起到心肌保护作用。TGF-β1/Smad作为DCM形成的关键通路,化橘红对其作用少有报道。作者通过建立DCM动物模型和心肌成纤维细胞增殖模型,旨在观察化橘红对DCM心肌细胞TGF-β1/Smad信号通路的干预作用以及心肌间质纤维化以及心功能的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级Wister大鼠40只,雄性,体质量250~300 g(合格证号体粤2006–0015)。饲养条件为恒温24±2 ℃,饲养环境符合实验动物环境设施要求。

1.2 主要试剂与药物

试剂:化橘红药液(浓度100%);链脲佐菌素;羟脯氨酸标准品(购自北京鼎国生物技术发展中心)。浓缩型I型胶原一抗、浓缩型Ⅲ型胶原一抗、浓缩型TGF-β1一抗(均购自武汉博士德生物工程有限公司);多聚赖氨酸,PBS缓冲液,DAB显色试剂盒(购自武汉博士德生物工程有限公司ED1022)。

仪器:MA110型电子分析天平(上海第二天平仪器厂生产),BIOFUGE13型台式高速离心机(美国BERRA),UV-1206型分光光度计(德国ZAISS),显微图象分析仪(MetaMorph/DP10/BX51型-美国通用图象公司),数码照相机(Olympus),显微镜(BX51,日本)。

1.3 方法

1.3.1 模型的建立与标本采集

1.3.1.1 DCM模型的建立与标本采集　雄性大鼠40只室温饲养,标准饲料。正常饲养1周后,禁食12 h,将链脲佐菌素用0.1 mmol/L、pH4.2的柠檬酸缓冲液新鲜配制,参照张春虹等的方法按55 mg/kg腹腔注射,后予5%葡萄糖溶液进水,48 h后换用自来水饮用。大鼠继续原饲料喂养12周后(自链脲佐菌素注射起),将血糖>16.7 mmol/L且具有多饮、多食、多尿的大鼠25只纳入实验组,其余列为空白对照组。将纳入实验组的大鼠随机分为DCM组、化橘红组。化橘红组大鼠给予化橘红400 mg/(kg·d)灌胃,DCM组和空白对照组(NC组)给予等量生理盐水灌胃。各组大鼠继续原饲料喂养至22周,分别在1、8、16、22周测量血糖。实验末,各组大鼠麻醉后,测量左室收缩压、左室舒张末压、左室腔内压力变化率最大值(±dp/dtmax)。将3组大鼠处死后心脏制备成约4~5 mm的组织块若干块,按常规方法将组织块进行处理。

1.3.1.2 心肌成纤维细胞增殖模型(CFb)的建立　取出生后1~3 d龄的大鼠,无菌开胸取心脏,D-Hank’s液清洗,剪成1 mm^3大小的碎片,0.125%胰蛋白酶反复消化(37 ℃水浴,8 min/次),分别收集各次消化上清液,离心(1000 r/min,5 min)弃上清,用含10%血清的IMDM培养基重悬沉淀制成细胞悬液,接种于培养瓶中,置37 ℃、5% CO_2培养箱内培养。用反复差速贴壁法去除内皮细胞及心肌细胞。实验采用第3~5代细胞。分为两组,化橘红预处理组为血清培养基加0.5 mmol/L化橘红药液,而对照组为等量血清培养基。

1.3.2 心功能测定

1.3.2 心功能测定　实验末将3组大鼠用3%戊巴比妥钠按1 mL/kg腹腔注射麻醉后,将心导管插入左心室,测量左室收缩压、左室舒张末压、左室腔内压力变化率最大值,观察化橘红对糖尿病大鼠心功能的影响。

1.3.3 病理组织学检查　将4%多聚甲醛固定后的大鼠心脏制备成约4~5 mm的组织块,按常规方法将组织块进行脱水,二甲苯透明,浸腊,包埋。将包埋的组织蜡块分别连续切片,切片厚5 mm,于60 ℃恒温箱中烤片6 h,用Masson染色后采用LEICA数字图像分析系统计算每例切片心肌间质绿染面积占整个视野的百分比,在光镜下观察心肌组织形态学改变。

1.3.4 测定心肌胶原总量　称取左心室心肌组织100 mg,制粉末后置于HCL液中酸解,用NaOH液滴定至pH为7,离心后取上清液加柠檬酸缓冲液、氯胺,混匀后氧化6 min,加过氯酸后混匀放置5 min,再加10%对二氨苯甲醛,于180 ℃水浴中放置6 min,取出后冰水浴中放置30 min,UV-1206型分光光度计560 nm处比色测定。同时用1~10 μg的羟脯氨酸标准品按上述相同步骤制作标准曲线。对照标准曲线,求得羟氨酸含量,然后换算成每克心肌组织中羟脯氨酸含量,再乘以7.46即得心肌胶原总含量。

1.3.5 心肌Ⅰ、Ⅲ型胶原免疫组化

1.3.5.1 免疫组化观察　NC组中Ⅰ型胶原呈索条状,平行或波浪形排列,分布于间质。在小血管周围呈不连续分布,Ⅲ型胶原呈细纤维状或网状排列,与Ⅰ型胶原分布相一致。DCM组中见Ⅰ、Ⅲ型胶原明显增多,排列紊乱,以炎细胞浸润的血管旁增多更为明显。化橘红组介于两者之间,接近NC组。

1.3.5.2 Ⅰ、Ⅲ型胶原含量　提取心肌组织,运用免疫组化ABC法(亲和素-生物素-过氧化物酶复合物法)检测Ⅰ、Ⅲ型胶原含量[6]。结果判定:组织中棕黄色为

阳性结果，采用图像分析软件对染色阳性物质进行测定，测定灰度均值和阳性面积百分比，Ⅰ、Ⅲ型胶原表达以免疫组化阳性指数(灰度均值×阳性面积百分比)表示。

1.3.6 Western印迹检测　提取心肌组织(细胞)总蛋白，以标准蛋白为内参照，以目的蛋白条带灰度与内参条带灰度的比值计算蛋白的相对表达量[7]。所有实验均重复3次。测量TGF-β1、MMP-9、MMP-2、TIMP-1、Smad、c-fos等蛋白含量。

1.3.7 CFb的免疫组化分析、Western印迹检测　取第3代CFb制成细胞悬液，给予细胞不同处理，用免疫荧光细胞化学染色法[4]检测iNOS蛋白、Cyclin D蛋白的表达、检测上清液中一氧化氮的变化、流式细胞仪(FCM)检测p27蛋白表达，Western印迹测量TGF-β1蛋白的含量，以标准蛋白为内参照，以目的蛋白条带灰度与内参条带灰度的比值计算蛋白的相对表达量[7]。

1.3.8 心肌组织 (细胞) 总RNA的提取和RT-PCR　取心肌组织约100 mg，放入匀浆器中，立即加入Trizol1 mL，在冰浴条件下用眼科剪将组织剪碎，用匀浆器将组织匀浆。弃上清，在冰浴中加入DEPC 20~30 μL，轻弹管底，使DNA溶解，-70 ℃保存备用。合成cDNA，设计与合成相应引物，进行RT-PCR。测量相应蛋白mRNA表达情况。以标准mRNA为内参照，以目的mRNA条带灰度与内参条带灰度的比值计算蛋白的相对表达量[7]。

1.4 统计学分析

数据均以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS13.0软件进行统计分析，所有数据进行正态分布检验。统计学方法两组间的比较采用t检验，多组间的比较采用方差分析法，其中两两比较用SNK法，并进行方差齐性检验，P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 化橘红干预后对血糖和心功能的影响

造模后的1、8、16、22周，化橘红组大鼠的血糖比DCM组显著降低(P<0.05)。实验末，化橘红组的左室收缩压、左室腔内压力变化率最大值明显高于DCM组(P<0.05)；化橘红组的左室舒张末压与DCM组相比不同程度下降(P<0.05，表1)。

表1 化橘红干预后对血糖和心功能的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	血糖(mmol/L)				左室收缩压(mmHg)	左室舒张末压(mmHg)	左室腔内压力变化率最大值(±dp/dt max)
		1周	8周	16周	22周			
化橘红组	14	5.53±0.59	6.61±1.07	8.83±1.24	10.75±2.16	13.82±3.18	6.28±2.04	4.29±1.39
DCM组	11	8.72±1.37	10.28±2.36	14.47±4.19	19.28±6.03	9.52±2.04	9.19±3.23	2.37±0.68
t		-1.532	-2.416	-3.313	-3.912	2.621	-2.128	1.372
P		0.041	0.023	0.019	0.008	0.017	0.032	0.048

2.2 光镜下心肌形态学改变

从心肌组织切片看，NC组大部分心肌纤维形态均匀，排列成束，肌束内见少量结缔组织及丰富的毛细血管，未见炎症细胞及纤维化。DCM组可见大部分心肌纤维肿胀、肥大、疏松，排列紊乱，有的可见肌纤维断裂、肥大，排列紊乱，甚至空泡变，细胞核固缩、裂解，细胞外间质增加，局灶性纤维组织增生，炎细胞浸润。化橘红组心肌纤维排列整齐，但是仍可见少部分区域肌纤维肿胀，未见炎症细胞浸润。

2.3 3组大鼠心肌各型胶原含量与心肌纤维化情况

实验末我们将3组大鼠的心肌组织标本处理后分别对其各型胶原含量、心肌羟脯氨酸含量、心肌胶原总含量、心肌间质纤维化%相比较。①与DCM组比较，化橘红组Ⅰ型胶原含量、Ⅰ/Ⅲ型胶原比值、心肌羟脯氨酸含量、心肌胶原总含量、心肌间质纤维化%均有不同程度的下降，且有统计学差异(P<0.05)。②DCM组与NC组比较，Ⅰ型胶原含量、Ⅰ/Ⅲ型胶原比值、心肌羟脯氨酸含量、心肌胶原总含量、心肌间质纤维化%均有显著的上升，且有统计学差异(P<0.05，表2)。

2.3 化橘红干预对信号通路的影响

实验末，化橘红组的TGF-β1蛋白及mRNA、MMP-9、MMP-2、TIMP-1蛋白、c-fos蛋白及mRNA、Smad2蛋白和Smad7蛋白的表达与DCM组相比显著下调(P<0.05，表3)。

2.4 化橘红对CFb增殖的影响

在实验末CFb模型中，与对照组相比，化橘红预处理组的TGF-β1蛋白、iNOS蛋白、一氧化氮、p27蛋白、p27蛋白、Cyclin D蛋白表达均有显著地上调(P<0.05，表4)。

3 讨论

DCM主要的病理表现为心肌肥大，心室质量/体质量比(心脏质量指数)增加，局灶性心肌坏死，细胞

表2 3组大鼠心肌各型胶原含量与心肌纤维化情况($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Ⅰ型胶原含量(*10^3)	Ⅰ/Ⅲ型胶原比值	心肌羟脯氨酸含量(μg/mg)	心肌胶原总含量(μg/mg)	心肌间质纤维化(%)
化橘红组	14	104.52±43.23*	1.14±0.22*	0.57±0.24*	4.38±0.79*	19.37±9.16*
DCM组	11	126.27±53.71#	1.52±0.31#	0.87±0.39#	6.93±1.75#	37.26±16.03#
NC组	15	83.63±32.16	0.84±0.22	0.36±0.17	3.52±0.25	2.21±0.35

*P<0.05 *vs* DCM组; #P<0.05 *vs* NC组.

表3 化橘红干预对信号通路的影响($\bar{x}\pm s$,%)

组别	n	TGF-β1 mRNA	TGF-β1	MMP-9	MMP-2	TIMP-1	Smad2	Smad7	c-fos	c-fos mRNA
化橘红组	14	46.38±22.71	34.29±10.37	25.38±8.16	25.94±15.48	23.73±7.04	26.34±9.19	21.47±7.12	25.78±11.48	34.79±16.38
DCM组	11	71.23±39.19	63.12±21.47	49.29±17.37	53.28±31.47	45.81±15.10	51.28±19.16	43.19±18.38	44.39±20.19	53.28±23.29
t		–8.192	–6.729	–5.381	3.192	–5.102	–5.729	–4.982	–5.720	–6.182
P		0.000	0.002	0.008	0.031	0.013	0.011	0.019	0.015	0.006

表4 化橘红对CFb增殖的影响($\bar{x}\pm s$,%)

组别	n	TGF-β1	iNOS	一氧化氮	p27	Cyclin D
对照组	14	31.28±16.26	21.84±11.74	12.28±6.81	3.14±1.05	24.12±9.64
化橘红预处理组	11	49.19±23.83	30.17±15.12	20.16±8.18	5.92±2.13	37.29±16.12
t		–5.917	–3.117	–2.921	–1.883	–4.039
P		0.008	0.021	0.035	0.042	0.009

外基质沉积,心肌纤维化[8]。DCM的发病机制较为复杂,与氧化应激和炎症反应的异常[9]、肾素-血管紧张素系统(RAS)的激活[10]、葡萄糖代谢障碍、细胞内钙超载[11]以及心肌间质纤维化[12]有关。在心肌组织的整个胶原网络中,Ⅰ/Ⅲ型胶原起主要作用,I型胶原决定心肌的僵硬度,而Ⅲ型胶原则决定心肌的顺应性[13]。本实验结果与高俊杰等[14]研究相同,DCM组的大鼠与NC组相比较,其Ⅰ型胶原和Ⅰ/Ⅲ型胶原比值显著增高,且心功能下降、心肌纤维化明显。这反映了心肌细胞间质纤维沉积及纤维化是临床上引起DCM的重要因素。柚皮苷是化橘红中重要的活性物质,国内外研究显示,柚皮苷可有效改善糖尿病时的糖代谢,降低血糖[4],同时减少心肌损伤,保护心肌,改善心功能[15]。在本次实验中,化橘红组大鼠在各时间点的血糖,与DCM组相比,均明显下降;其心收缩、舒张功能有不同程度的改善。综合病理形态学结果也证实化橘红确实能改善DCM大鼠的糖代谢,对大鼠心肌有确切的保护作用。

研究表明,TGF-β1/Smad通路是DCM炎症反应中的重要环节[16-17]。TGF-β1可以增加大鼠心肌成纤维细胞产生胶原和诱导其分化为心肌成纤维细胞能力,使胶原蛋白增加,加剧心肌纤维化[14]。而Smads作为TGF-β1受体胞内激活底物,除可介导TGF-β1的信号转导外,还可介导其下游致心肌纤维化和心肌肥厚的信号转导[18]。本实验发现化橘红组的大鼠较DCM组,其TGF-β1蛋白与mRNA的表达明显下调,Smad2、7蛋白的表达也明显降低。在心肌成纤维细胞模型中,化橘红预处理组的TGF-β1蛋白表达明显低于对照组。表明化橘红能有效通过抑制TGF-β1/Smad通路,抑制DCM大鼠的心肌纤维化进程。

心肌MMPs是基质降解的主要调节因子,其活性增强见于DCM中[19],同时伴随组织型基质金属蛋白酶抑制剂(TIMP)-1蛋白表达的上调,MMPs/TIMPs系统与胶原的降解有重要关系[20]。在本研究中,化橘红组与DCM组相比,TGF-β1和MMPs蛋白的表达均有所下调,该结果与Siena[21]的研究类似。TGF-β作为MMPs/TIMPs系统重要的调控因子,本实验显示化橘红通过对其表达的抑制,调控MMPs/TIMPs,改善心肌胶原的降解作用,从而改善心肌纤维化进程。本研究还发现,用化橘红干预过的大鼠、心肌成纤维细胞,其氧化应激和炎症反应的相关蛋白及mRNA表达也下降,如c-fos蛋白[22]、一氧化氮[23]、iNOS蛋白、p27蛋白[24]、Cyclin D蛋白[25]等。这些结果提示化橘红调控DCM的心肌纤维化进程可能还与多种通路相关。

实验结果提示化橘红对DCM有明显的积极作用,尤其能调控其心肌纤维化进程中的关键环节,对化橘红进一步提纯应用于DCM治疗用药有参考意义。同时,明确化橘红对TGF-β1/Smad通路的调控作用能进一步完善其药理机制,使其应用在更多疾病的治疗中。因此,化橘红对DCM中TGF-β1/Smad通

路起到了抑制作用，从而调控其下游的MMPs/TIMPs等通路，改善DCM的心肌纤维化进程，抑制心肌肥厚，减少心肌的损伤。而化橘红对于DCM心肌纤维化的抑制作用是否还存着其他重要通路，还需要进一步实验探究。

参考文献：

[1] 任 骏, 罗雪琚. 糖尿病心肌病的基础与临床研究现状[J]. 心血管病学进展, 2001, 22(5): 299-302.

[2] 黄娅茜, 王 宪, 孔 炜. 糖尿病心肌病发病机制的研究进展[J]. 生理科学进展, 2010, 41(1): 31-6.

[3] 莫小路, 蔡岳文, 曾庆钱. 中药化橘红的研究进展[J]. 食品与药品, 2007, 9(6): 39-41.

[4] Jung U, Lee MK, Park YB, et al. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mrna levels in type-2 diabetic mice[J]. Intern J Biochem Cell Biol, 2006, 38(7): 1134-45.

[5] 梁建光, 吴 铿. 柚皮苷对糖尿病心肌病大鼠心肌超微结构和缺氧诱导因子1α的影响[J]. 国际心血管病杂志, 2012, 39(2): 113-7.

[6] 丛 丽, 李益明, 俞茂华, 等. 黄芪多糖对糖尿病心肌病变仓鼠心肌胶原表达的影响[J]. 中国临床康复, 2006, 10(7): 64-6.

[7] 欧倩滢. Epac/Akt信号通路在GLP-1受体激动剂抑制糖尿病大鼠心肌细胞凋亡中的作用[D]. 天津: 天津医科大学, 2013.

[8] Fischer M, Baessler A, Hense HW, et al. Prevalence of left ventricular diastolic dysfunction in the community. Results from a Doppler echocardiographic-based survey of a population sample[J]. Eur Heart J, 2003, 24(4): 320-8.

[9] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications[J]. Nature, 2001, 414(6865): 813-20.

[10] Yaras N, Bilginoglu A, Vassort G, et al. Restoration of diabetes-induced abnormal local Ca2+ release in cardiomyocytes by angiotensin II receptor blockade[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(2): H912-20.

[11] Zhao XY, Hu SJ, Li J, et al. Decreased cardiac sarcoplasmic reticulum Ca2+-ATPase activity contributes to cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. J Physiol Biochem, 2006, 62(1): 1-8.

[12] Morrisey K, Evans RA, Wakefield L, et al. Translational regulation of renal proximal tubular epithelial cell transforming growth factor-beta1 Generation by insulin[J]. Am J Pathol, 2001, 159(5): 1905-15.

[13] 武利军. 心肌纤维化Ⅰ、Ⅲ型胶原病理形态及相关血清标志物改变的研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2002.

[14] 高俊杰, 潘晓黎, 吴 伟, 等. 转化生长因子β1和胶原蛋白与糖尿病心肌纤维化的实验研究[J]. 中国老年学杂志, 2006, 26(4): 505-7.

[15] Cariño CR, Álvarez-González Á. Effect of naringin on the dna damage induced by daunorubicin in mouse hepatocytes and cardiocytes[J]. Biolog Pharmaceut Bulletin, 2010, 33(4): 697-701.

[16] Sun Y, Zhang J, Zhang JQ, et al. Local angitotensinⅡand transforming growth factorβ1 in renal fibrosis of rats[J]. Hypertension, 2004, 35(5): 1078-84.

[17] Martin J, Kelly DJ, Mifsud SA, et al. Tranilast attenuates cardiac matrix deposition in experimental diabetes: role of transforming growth factor-beta[J]. Cardiovasc Res, 2005, 65(3): 694-701.

[18] 肖一佳, 沈祥春, 李杰平, 等. 心肌纤维化与tgf-β-smad信号系统[J]. 中国新药杂志, 2016, 10(2): 182-6.

[19] Tyagi SC, Rodriguez W, Patel AM, et al. Hyperhomocysteinemic diabetic cardiomyopathy: oxidative stress, remodeling, and endothelial-myocyte uncoupling[J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2005, 10(1): 1-10.

[20] Li Q, Sun Z, Wang Y, et al. The roles of mmp-2/timp-2 in extracellular matrix remodelling in the hearts of stz-induced diabetic rats[J]. Acta Cardiologic, 2007, 62(5): 485-91.

[21] Siena S, Sartore-Bianchi A, Nicolantonio FD, et al. Naringin suppresses cell metastasis and the expression of matrix metalloproteinases (mmp-2 and mmp-9) via the inhibition of erk-p38-jnk signaling pathway in human glioblastoma[J]. Chemic Biologic Interact, 2015, 244(8): 573-5.

[22] 纪 征, 尚小明, 张 燕, 等. c-myc、c-fos mRNA及相关蛋白在糖尿病大鼠心肌细胞中的表达[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(22): 2888-91.

[23] Rani N, Bharti S, Manchanda M, et al. Regulation of heat shock proteins 27 and 70, p-akt/p-enos and mapks by naringin dampens myocardial injury and dysfunction in vivo after ischemia/reperfusion[J]. PloS One, 2013, 8(12): 57-61.

[24] 纪 征, 许丽辉, 张 燕, 等. 糖尿病大鼠心肌细胞中survivin、p27 mRNA表达及相关蛋白变化的研究[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(2): 166-8.

[25] 徐天娇, 刘 勇, 邓雅婷, 等. 胰岛素联合硒抑制糖尿病心肌病大鼠p38mapk/cbp通路减少心肌细胞凋亡[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(7): 926-30.